

「第二回 質量分析の定量セミナー」報告

日時：2014年6月24日（火）14:00～15:30

場所：生物科学研究棟 3階大セミナー室（S311）

講師：サーモフィッシャーサイエンティフィック（株） 肥後 大輔 先生

内容：「定量プロテオーム解析のアプローチ」

- ・定量的プロテオーム解析を総括的に、お話しいただいた。

者：22名、資料

セミナー参加のみ配布：1名

主任研究員室：4室

環境資源科学研究センター：1グループ、1ユニット

脳科学総合研究センター：1チーム

グローバル研究クラスタ：1チーム

グローバル研究クラスタの教育セミナー第2弾として、3回シリーズで質量分析の定量測定方法を中心に講演を行った。第2回はプロテオミクスの定量について、MSとMS/MSを使った網羅的解析からターゲット分析まで、SLIAC,TMT,DIA,SIM,SRM,PRMに分類して、特にサーモのQ-ExactiveやTSQ Quantivaを用いた定量についての実例を交えてご講演頂いた。また、ASMSで発表された新機種の紹介もあった。参加者から、多くの質問があった。ノンラベル定量する際、DIA（データ非依存的分析）とDDA（データ依存的分析）の違いについての質問は、DDAは、定量の対象となる同定数は多いが、分析ごとに同定されるペプチドが異なる点が問題となり、DIAではいつも同じMSを分析するので結果は安定しているとの説明があった。新しいTSQ QuantivaのニュートラルブロッカーとQ-Exactiveの曲がった導入部との違いについての質問や新機種についての質問もあった。

終了予定時間が10分伸び、15:10に終了しました。

アンケート結果（回答者：20名）

教育セミナーの内容は？

難しかった：7名、適切であった：13名、易しかった：0名

感想は？（複数回答有）

- ・定量法について知見を得ることができ良かった。
- ・新技術が多く、理解するのが難しかった。
- ・定量プロテオーム解析の実際を学ぶことができ、大変参考になった。
- ・説明が分かり易かった。
- ・実際の解析例など論文が紹介されたりすると、より具体的に分かり易いかもしれないと思った。
- ・いろいろな定量の方法が出てきたので、具体的な例から、どういう時に、どの方法が良いということ、もう少し詳しく聞きたかった。
- ・定量解析について大変分かり易い説明であった。更に更に新しい装置が出たとのことに驚いた。
- ・それぞれの前処理方法と測定、DATA の出し方について分かった。
- ・新装置の新技術について学べて良かった。
- ・高い感度で定量できるようになっていることが分かった。
- ・真空を落とさずに洗浄ができるのが良いと思った。
- ・Neutral Blocker 等、進化が目覚ましく驚いた。
- ・装置をいつ買い替えるか、更に悩む所だ。
- ・参考になりました。
- ・新しい TSQ の技術が素晴らしい。特に、イオン源の汚れ対策。現行機にもニュートラルブロッカーが欲しい。
- ・定量と新製品の話が聞けて良かった。
- ・分からない所もあったが、興味を持って最後まで聞くことができた。

以上

● 定量プロテオーム解析のアプローチ

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社
CMD アプリケーション部
肥後 大輔

● The world leader in serving science

プロテオーム解析

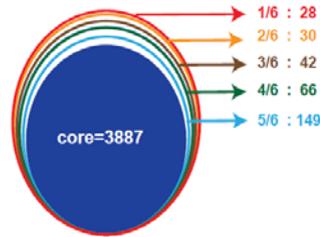
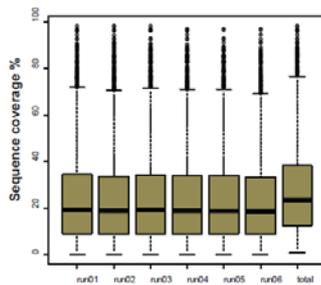


Easy nLC+Spray – 大規模プロテオーム解析

- **Near-complete, rapid and robust proteome analysis**

- single-shot LC-MS/MS system
- **50 cm column length**
- **4 h gradient**
- **35 °C (nano UHPLC)**

>4,000 identified proteins per run
Median sequence coverage 23%
1% FDR

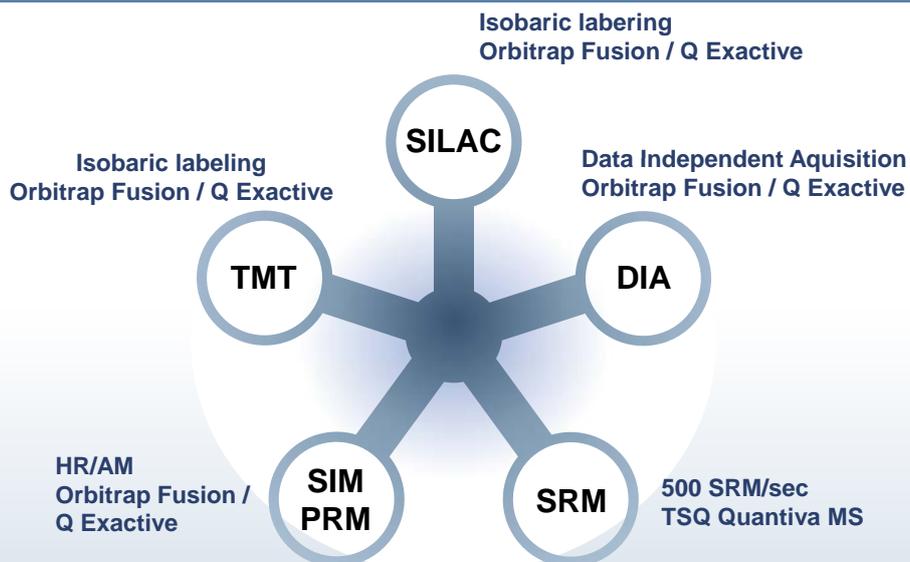


3

Nagaraj et al., Systems-wide perturbation analysis with near complete coverage of the yeast proteome by single-shot UHPLC runs on a bench-top Orbitrap. MCP 2011, M111.013722..

ThermoFisher
SCIENTIFIC

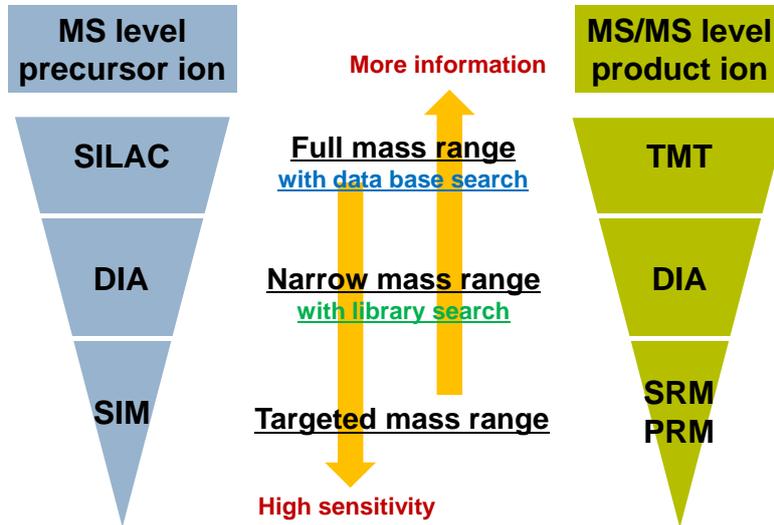
Multiplexed Protein Quantification Strategies



4

ThermoFisher
SCIENTIFIC

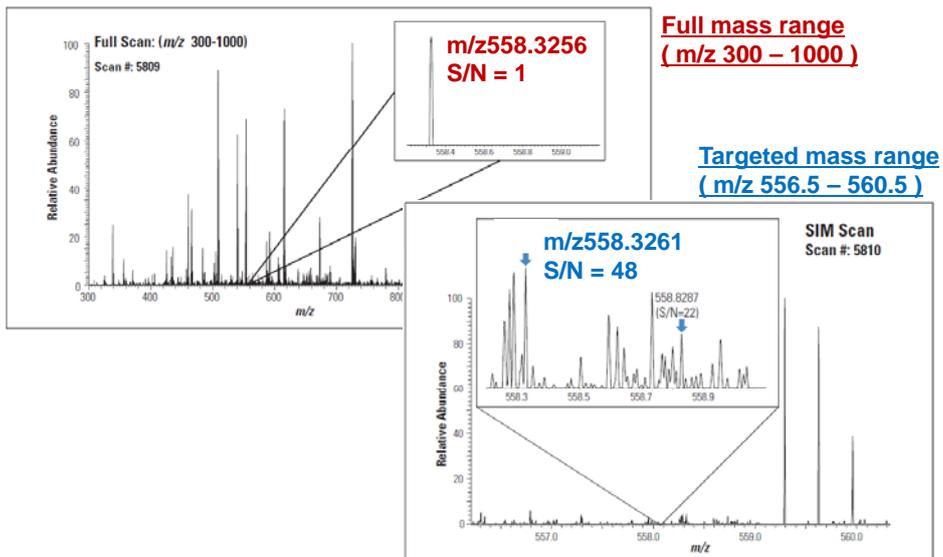
Multiplexed Protein Quantification Strategies



5

ThermoFisher
SCIENTIFIC

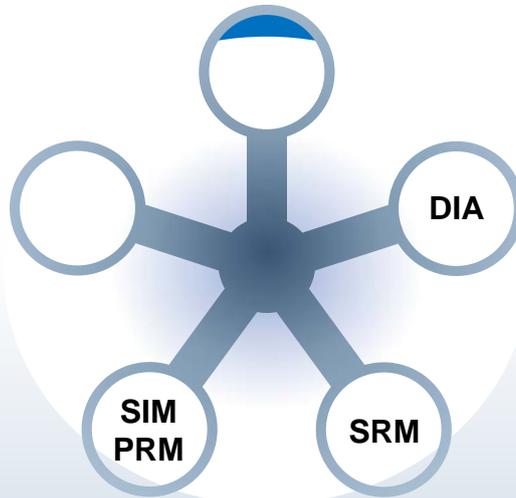
Mass range effect



6

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Multiplexed Protein Quantification Strategies

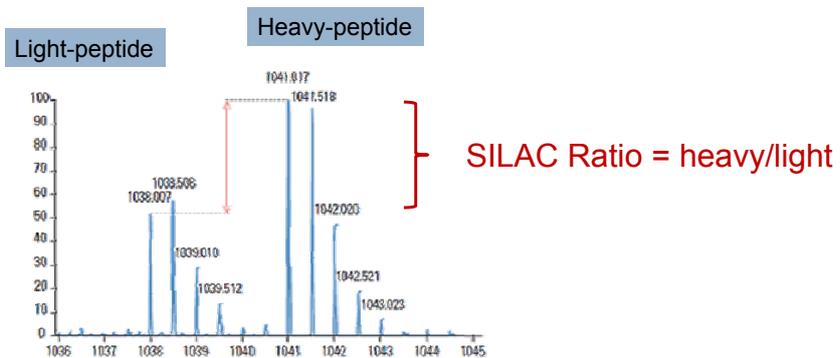


7

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Isobaric Labeling: SILAC

Stable Isotope Labeling with Amino Acids in Cell Culture

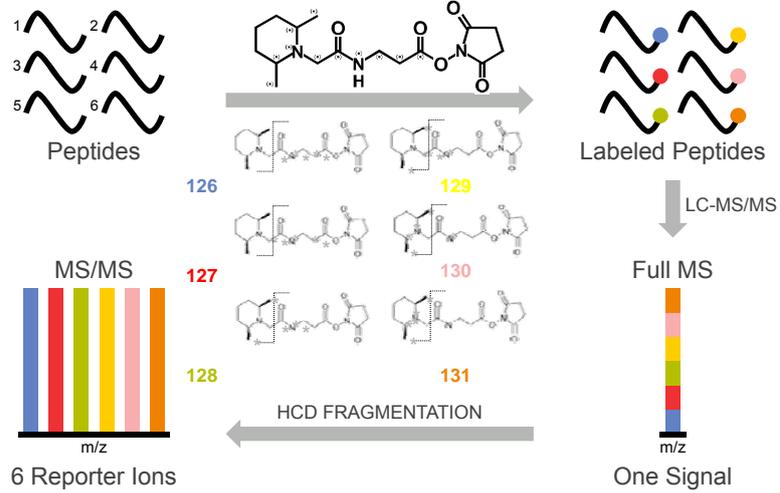


8

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Isobaric Labeling: TMT 6plex

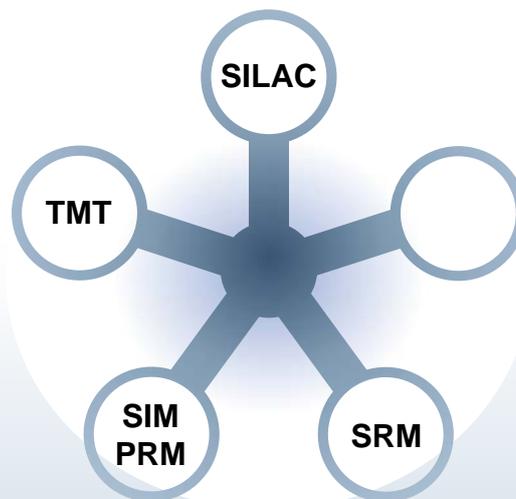
Isobaric mass tagging on peptide



9

ThermoFisher
SCIENTIFIC

DIA : Label Free Protein Quantification



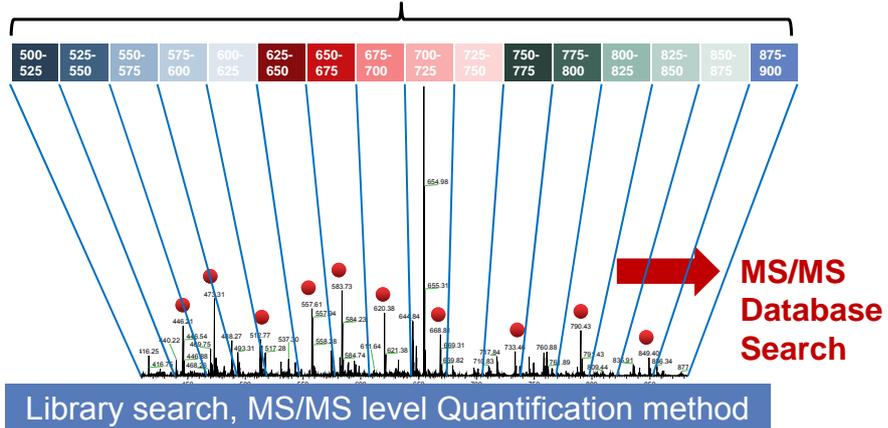
10

ThermoFisher
SCIENTIFIC

DIA : Data Independent Acquisition

Data Independent Acquisition

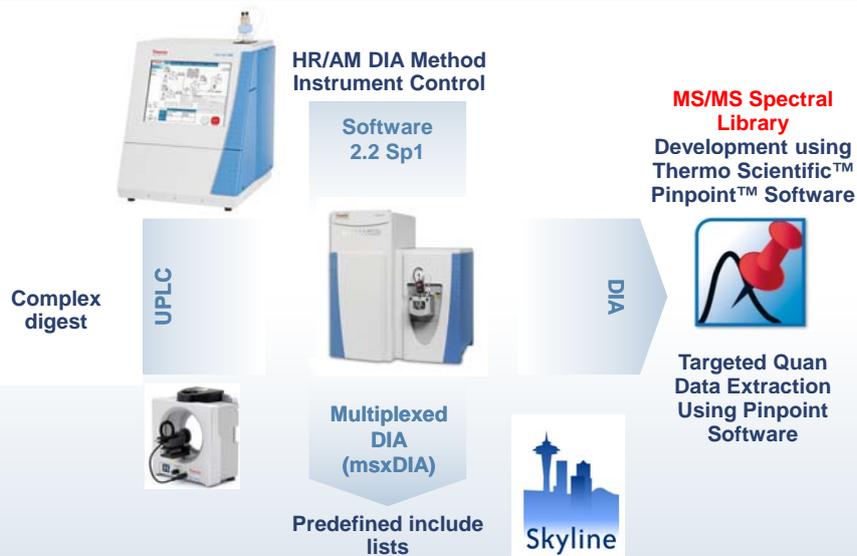
16 of 25 Da isolation **wide** windows = 400 m/z



11

ThermoFisher
SCIENTIFIC

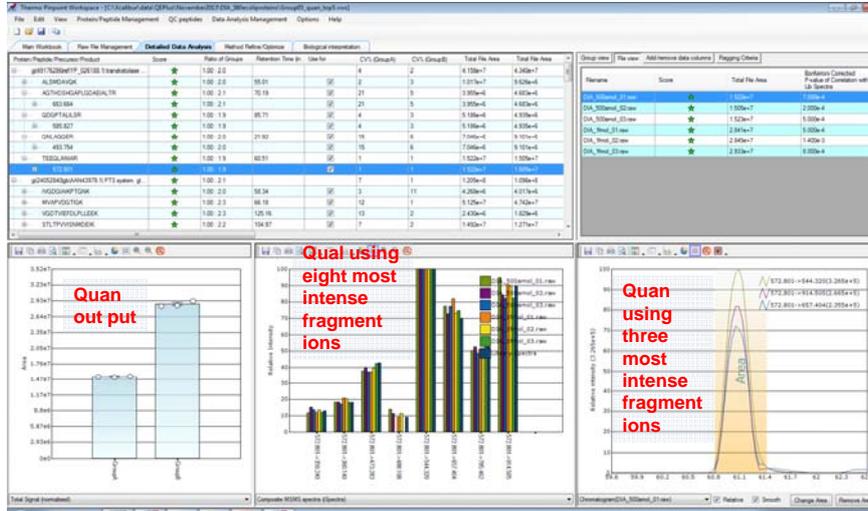
Leading Portfolio of MS Quantification Solutions



12

ThermoFisher
SCIENTIFIC

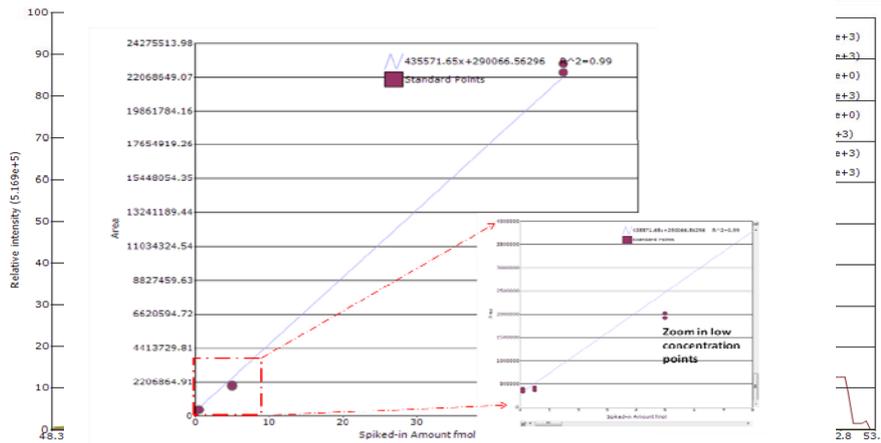
Simultaneous Qualification and Quantification Using Pinpoint



13

ThermoFisher
SCIENTIFIC

DIA Performance with Wide Isolation Window



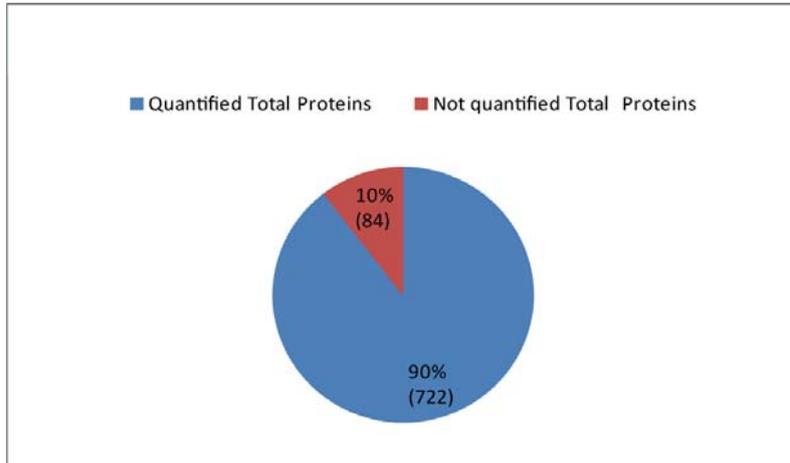
Library search, MS/MS level Quantification method

14

ThermoFisher
SCIENTIFIC

90% of Total Targeted Proteins Quantified

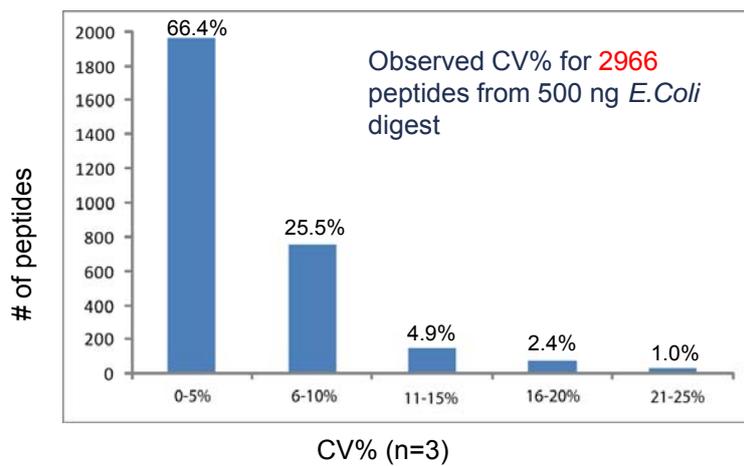
Quantitative summary for targeted 806 proteins from E.Coli



15

ThermoFisher
SCIENTIFIC

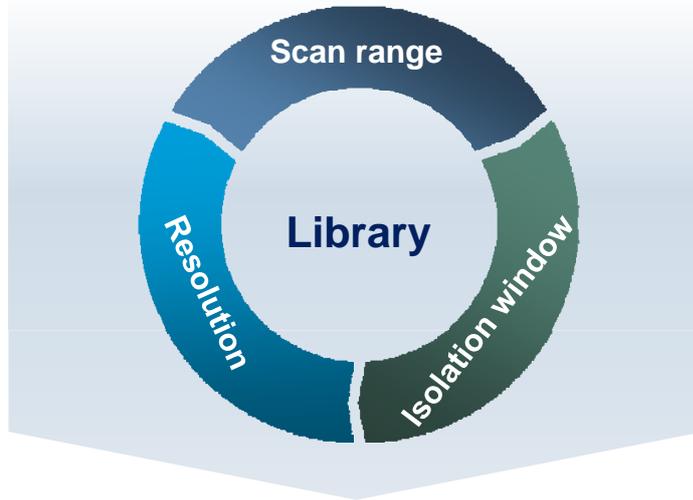
Excellent Reproducibility



16

ThermoFisher
SCIENTIFIC

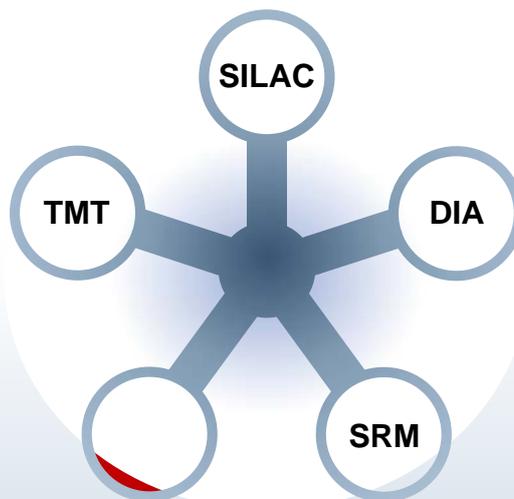
DIA : Data Independent Acquisition



17

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Multiplexed Protein Quantification Strategies

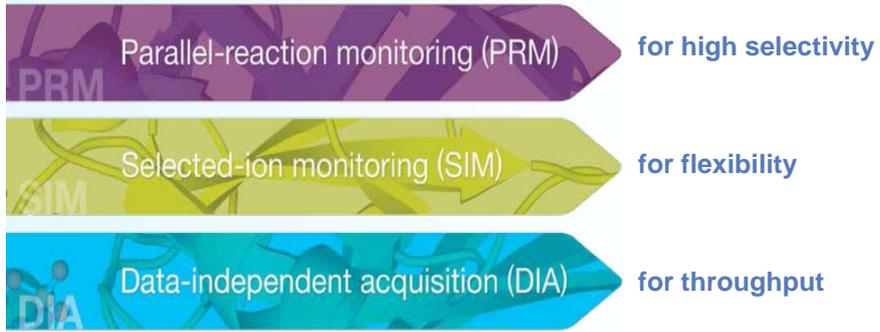


18

ThermoFisher
SCIENTIFIC

HR/AM Targeted Protein Quantification

Three targeted quantification methodologies using HR/AM

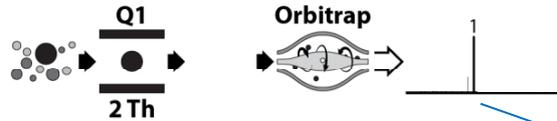


19

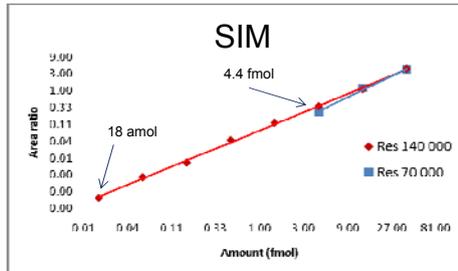
ThermoFisher
SCIENTIFIC

HR/AM SIM

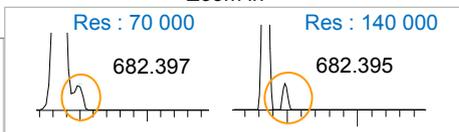
B SIM



Dilution curves



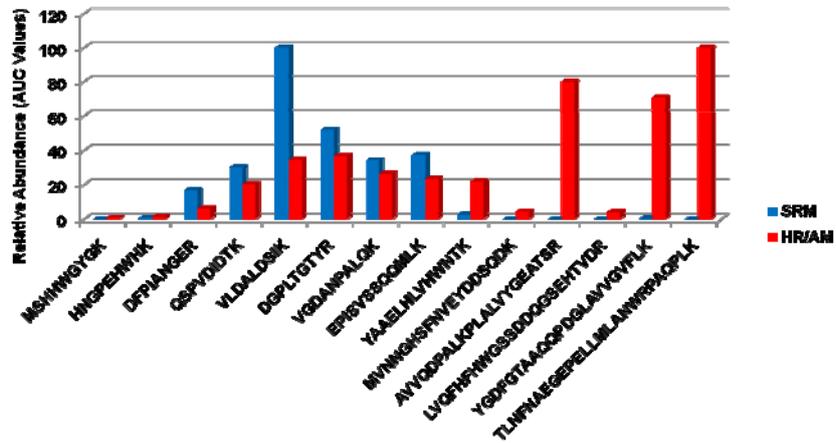
Zoom in



20

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Comparing Traditional SRM with HR/AM SIM



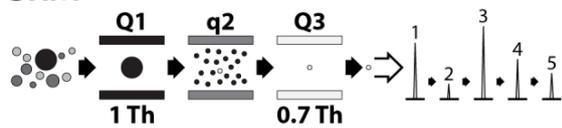
HR/AM quan works for a much wider range of peptides

21 Data courtesy of Scott Peterman, Thermo Scientific

ThermoFisher
SCIENTIFIC

PRM = Parallel Reaction Monitoring (multiplexed t-MS²)

A SRM

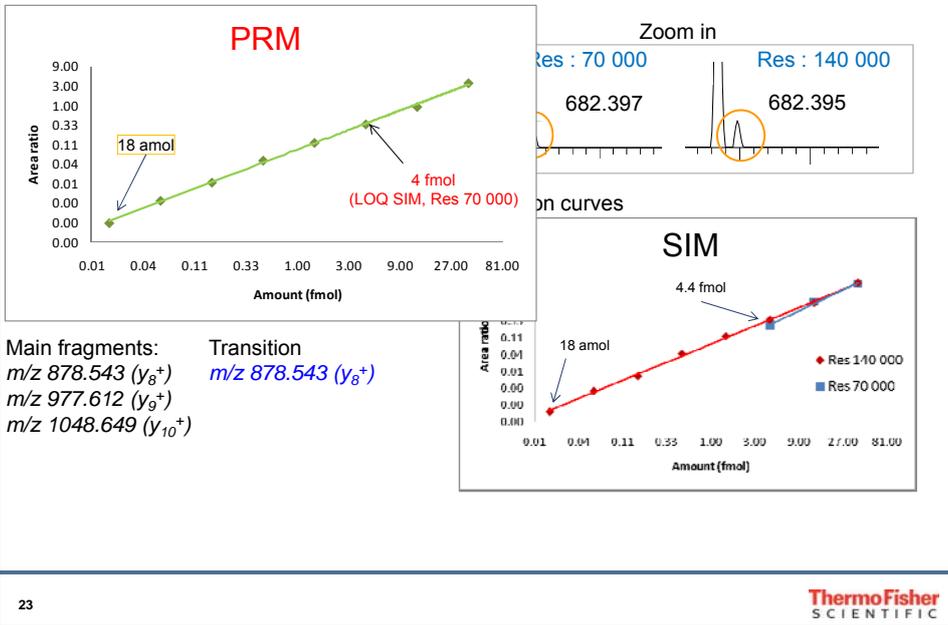


• Serial monitoring

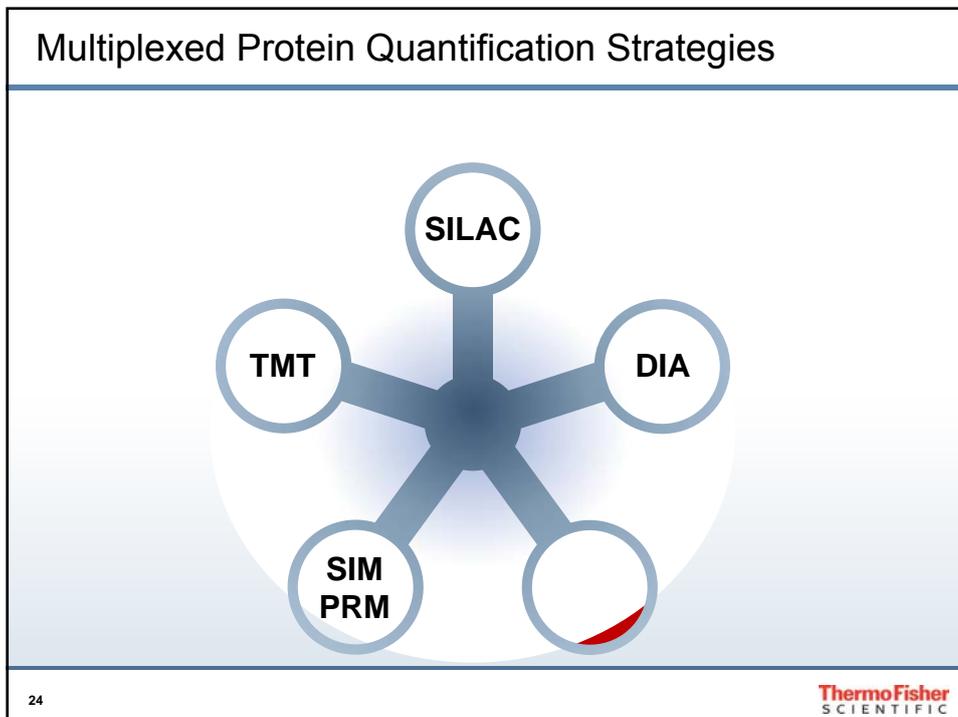
22 Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. Peterson et al., MCP 2012, O112.020131

ThermoFisher
SCIENTIFIC

PRM for Highest Selectivity

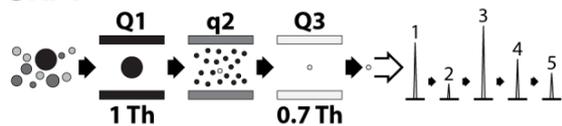


Multiplexed Protein Quantification Strategies



SRM

A SRM



- Serial monitoring

25 Parallel reaction monitoring for high resolution and high mass accuracy quantitative, targeted proteomics. Peterson et al., MCP 2012, O112.020131

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Triple Quad mass spectrometer



TSQ Endura

- 高感度定量のスタンダードシステム
- 耐久性(=Endurance)をさらにアップ
- 使い易さを追求したソフトウェア
- 堅牢性の向上



TSQ Quantiva

- 世界最高クラスの高感度定量システム
 - TSQ Vantageの約10倍感度アップ
 - 新たなテクノロジーを搭載
 - アトグラムレベルの感度
- 使い易さと堅牢性をアップ

26

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva

高い耐久性を兼ね備えた高感度LC-MS/MS

- ・ 質量範囲 : m/z 10~1,850
- ・ 高速pos/neg切り替え (<25 ms)
- ・ より高感度に 新たなIon Funnelを搭載
四重極RF設定の変更
- ・ 更なる耐久性 Neutral Blocker
- ・ 多成分SRM分析を支援する

AIM
TECHNOLOGY

Active Collision cell



27 AIM=Active Ion Managementの略

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -

新しいイオンファンネル

1

ニュートラルブロッカー

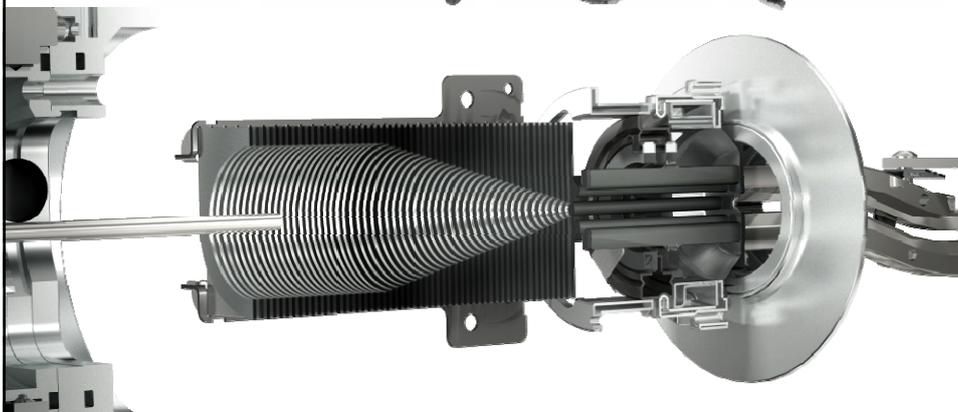
2

四重極RF設定の変更

3

Active collision cell

4



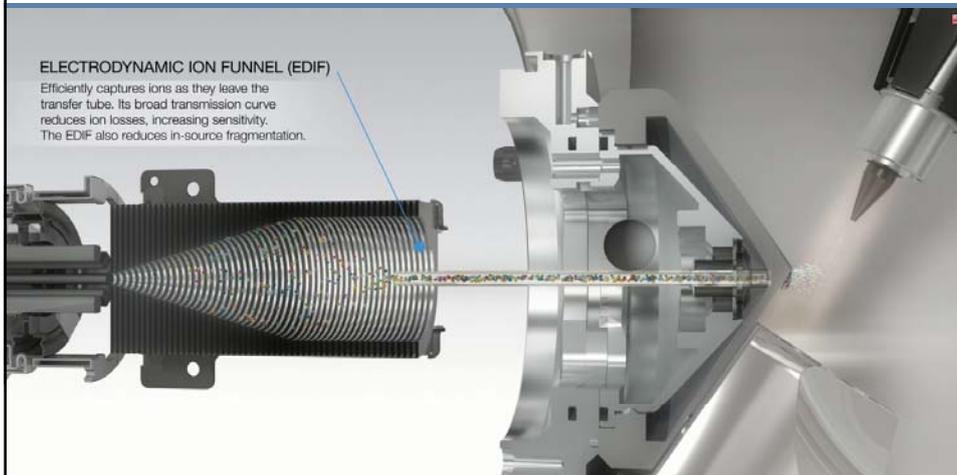
28

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Ion Funnel

ELECTRODYNAMIC ION FUNNEL (EDIF)

Efficiently captures ions as they leave the transfer tube. Its broad transmission curve reduces ion losses, increasing sensitivity. The EDIF also reduces in-source fragmentation.



効率よくイオンを収束→感度UP!

29

ThermoFisher
SCIENTIFIC

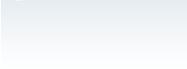
TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -

新しいイオンファンネル



ニュートラルブロッカー

2



四重極RF設定の変更

3



Active collision cell

4



30

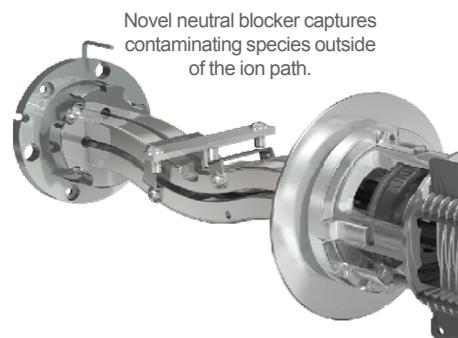
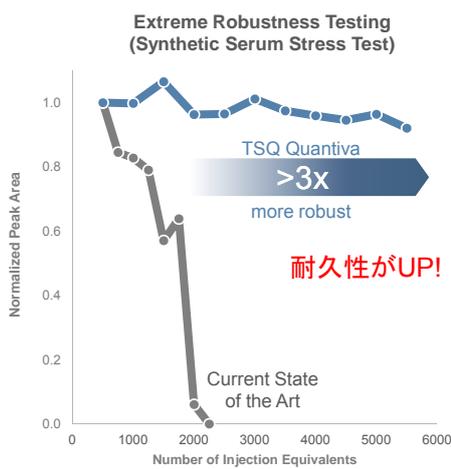
ThermoFisher
SCIENTIFIC

Neutral Blocker



31

耐久性



32

TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -

1 新しいイオンファンネル

2 ニュートラルブロッカー

3 四重極RF設定の変更

4 Active collision cell

Equal Amplitude
(Balanced)

33

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -

1 新しいイオンファンネル

2 ニュートラルブロッカー

3 四重極RF設定の変更

4 Active collision cell

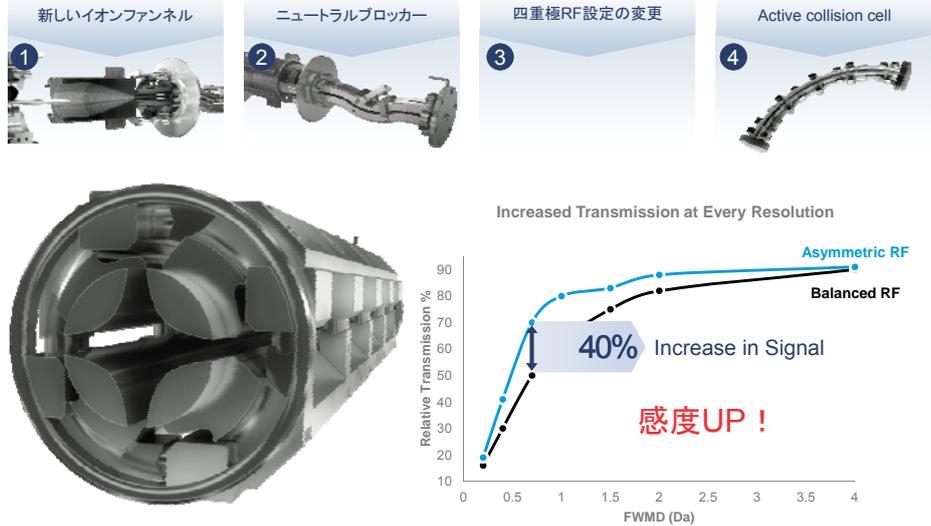
Equal Amplitude
(Balanced)

10% Bias Amplitude
(Asymmetric)

34

ThermoFisher
SCIENTIFIC

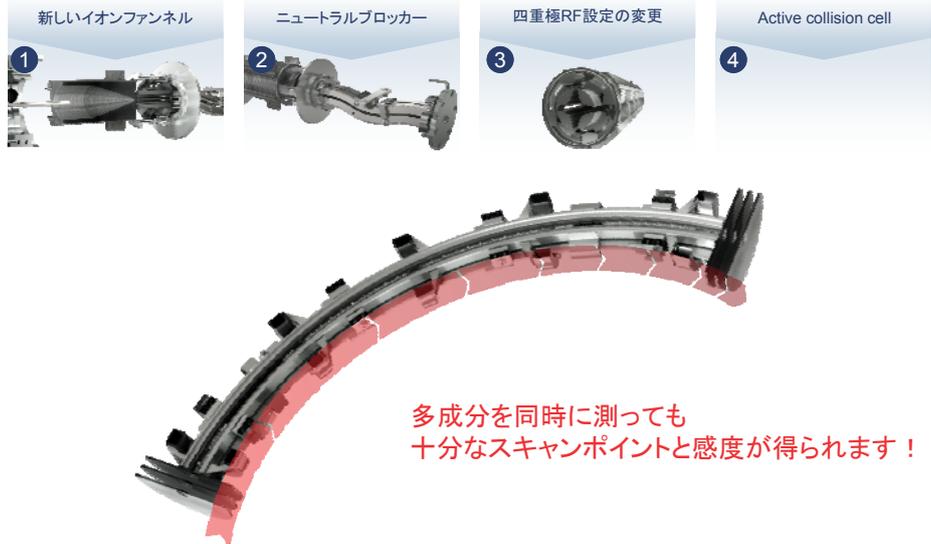
TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -



35

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva - AIM Technologyについて -



36

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva : 感度



Challenge

- サンプル量が少ない試料
 - マトリクスの多い試料
- 少ない注入量で高感度に測定したい

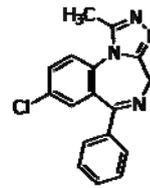
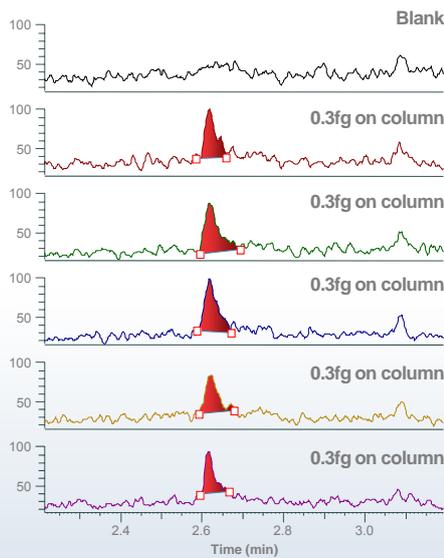
TSQ Quantiva MS

AIM技術を採用したTSQ Quantivaが解決します

37

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva の感度 : アルプラゾラム



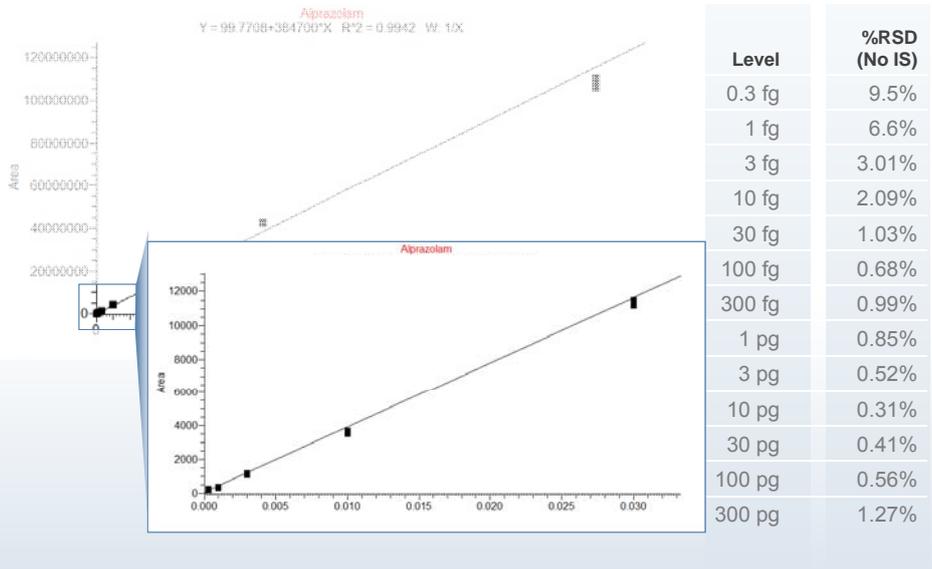
0.3 fg Alprazolam on Column neat.

RSD = 9.5% (auto-integrated)

38

ThermoFisher
SCIENTIFIC

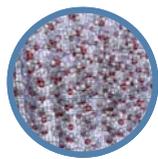
6桁の広いダイナミックレンジ：アルプラゾラム



39

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva・TSQ Endura : 堅牢性



Challenge

長期間の連続稼働時でも安定した感度を維持したい



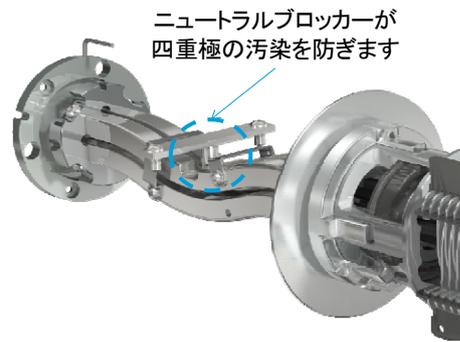
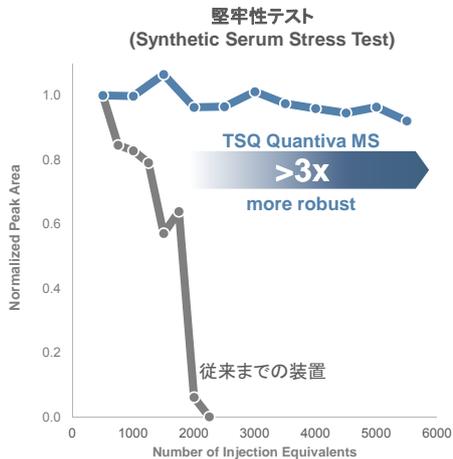
TSQ Quantiva MS

湾曲型四重極レンズとニュートラルブロッカーが高い堅牢性を維持

40

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva : 堅牢性

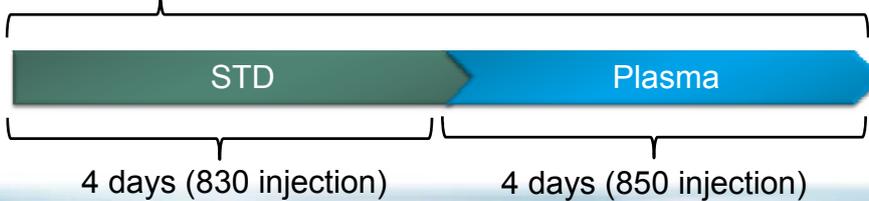


41

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva : 耐久性試験

● Total 8 days test



● STD solution

1.0 ng/mL in 80%ACN aq.

● Plasma sample prep.

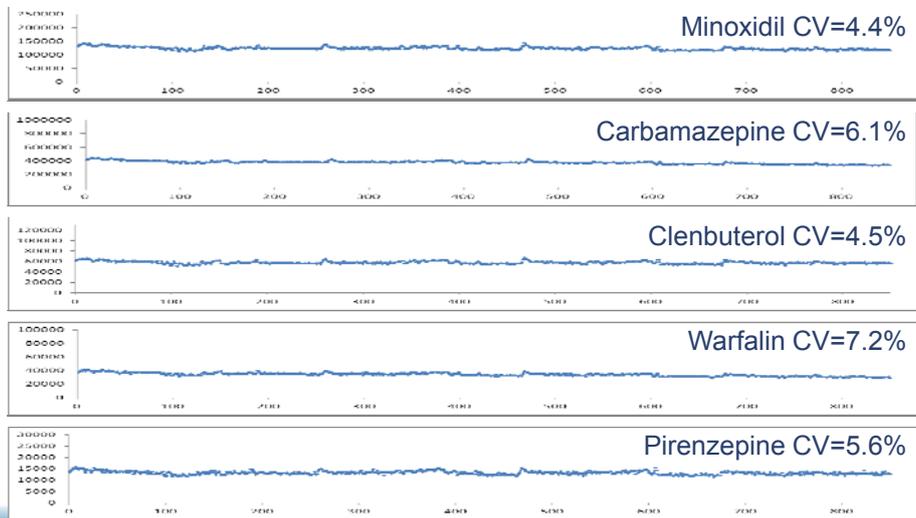
Bovine plasma : ACN= 1:4 crashed
| 10,000 rpm, 3 min
Supernatant
| added STD
1.0 ng/mL spiked plasma sample

42

ThermoFisher
SCIENTIFIC

優れた耐久性: プラズマ添加試料 4 days, 850 injection

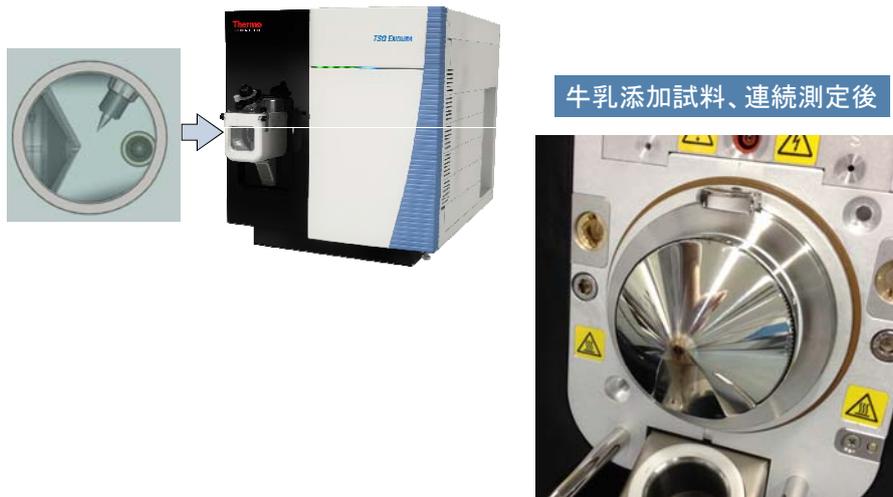
Plasma: 除タンパク試料



43

ThermoFisher
SCIENTIFIC

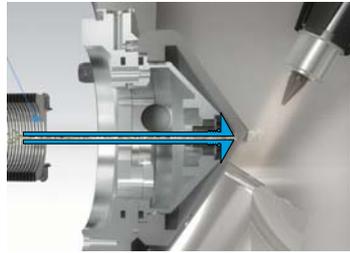
Sweep Cap: 真空を落とさず簡単洗浄!



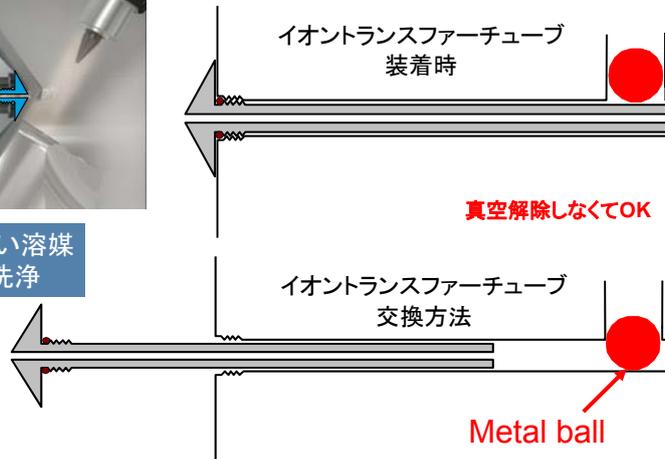
44

ThermoFisher
SCIENTIFIC

イオンランスファーチューブ: 真空を落とさず簡単洗浄!



汚れが溶けやすい溶媒
による超音波洗浄

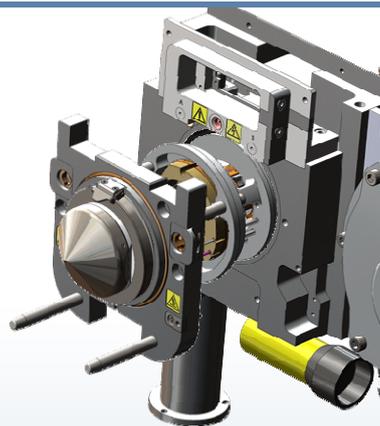


45

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva - メンテナンスの簡単さ

工具不要



46

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva・TSQ Endura : 操作性



Challenge

- 条件の最適化
- 分析メソッドの作成
- 直感的で操作が簡単なソフトウェア

TSQ Quantiva MS

ドラッグ・アンド・ドロップのメソッド
作成画面を採用

47

ThermoFisher
SCIENTIFIC

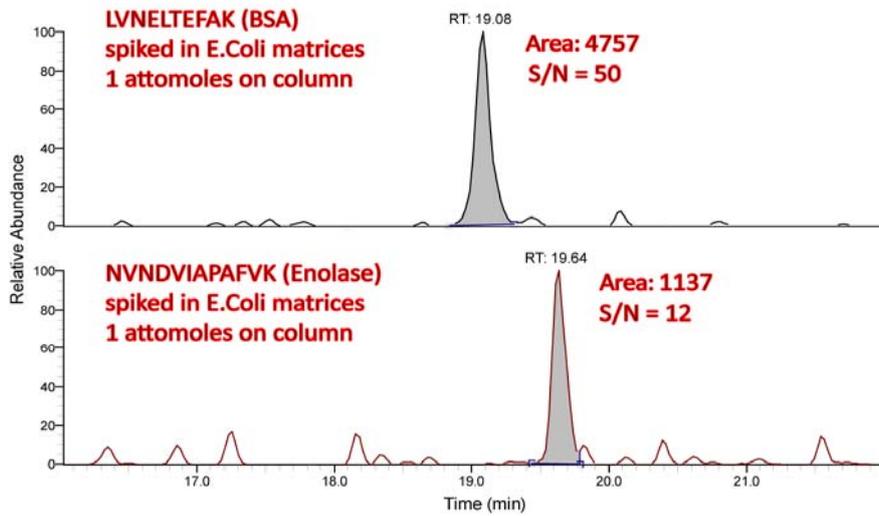
ターゲットタンパク質定量



48

ThermoFisher
SCIENTIFIC

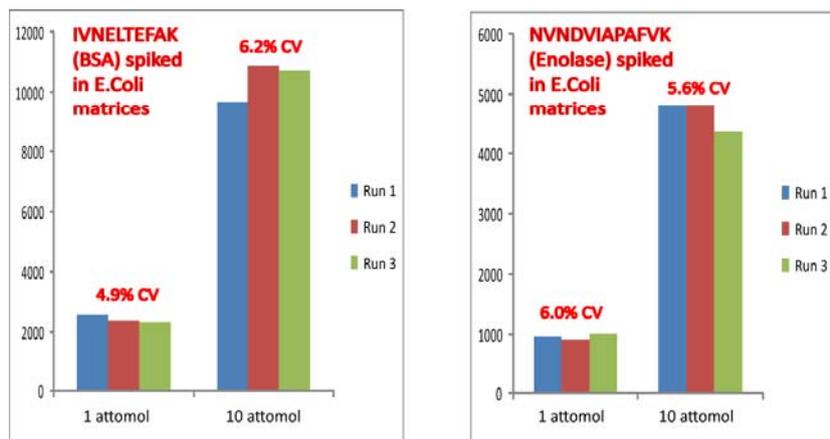
Attomoオーダーでのペプチド定量感度



49

ThermoFisher
SCIENTIFIC

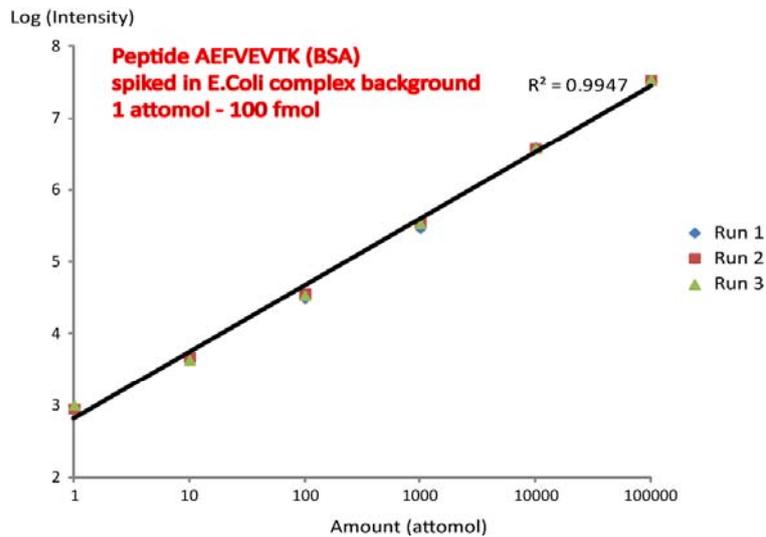
Attomol オーダーでのペプチド定量の安定性



50

ThermoFisher
SCIENTIFIC

amol ~ fmolをカバーする広いダイナミックレンジでのペプチド定量

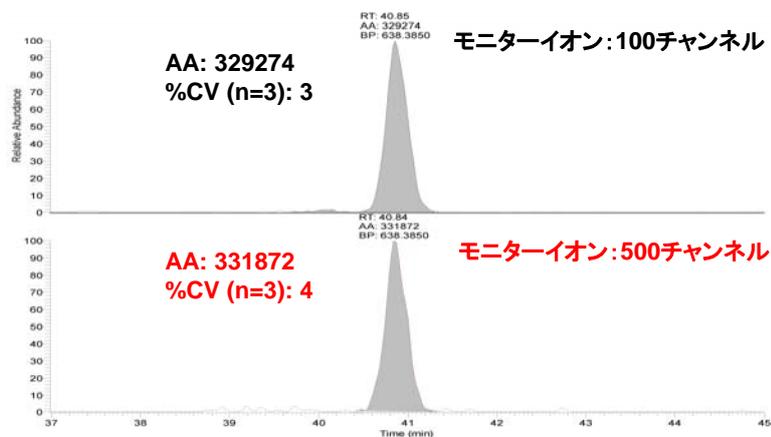


51

ThermoFisher
SCIENTIFIC

TSQ Quantiva :Faster Scan Speed (500 Transitions/Sec)

Peptide A spiked in 1 ug cell digests



52

Data Courtesy of OnCoplexDx

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Pinpoint Software



- タンパク質同定結果から自動化されたターゲット定量メソッド開発
- SRMメソッド構築の最適化
- データ解析の自動化
 - Qualitative Analysis: タンパク質/ペプチドの同定
 - Quantitative Analysis: タンパク質/ペプチドの量(濃度)の決定

53

ThermoFisher
SCIENTIFIC

QuantivaとPinpointを使ったメソッド構築と定量分析の流れ

- E. Coli消化物にスパイクされた12種類の標準タンパク質消化物をターゲットとした定量メソッドの構築と最適化
- Sample A: 500ngのE. Coliにスパイクされた5fmol/uLの12種類の標準タンパク質
- Sample B: 500ngのE. Coliにスパイクされた12種類の標準タンパク質。12種類のうち四つずつを0.5fmol/uL、5fmol/uL、50fmol/uLの濃度違いを作成。

54

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Pinpoint 1.3によるSRM測定メソッドの作成

MASCOT結果など、Proteome解析結果ファイルのインポート。

55

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Pinpoint 1.3によるSRM測定メソッドの作成

ターゲットとするペプチドを選択することで同定結果から得られたMSMSパターンからSRMIに最適と推奨される定量イオンをソフトが自動的に選別

942 transitions

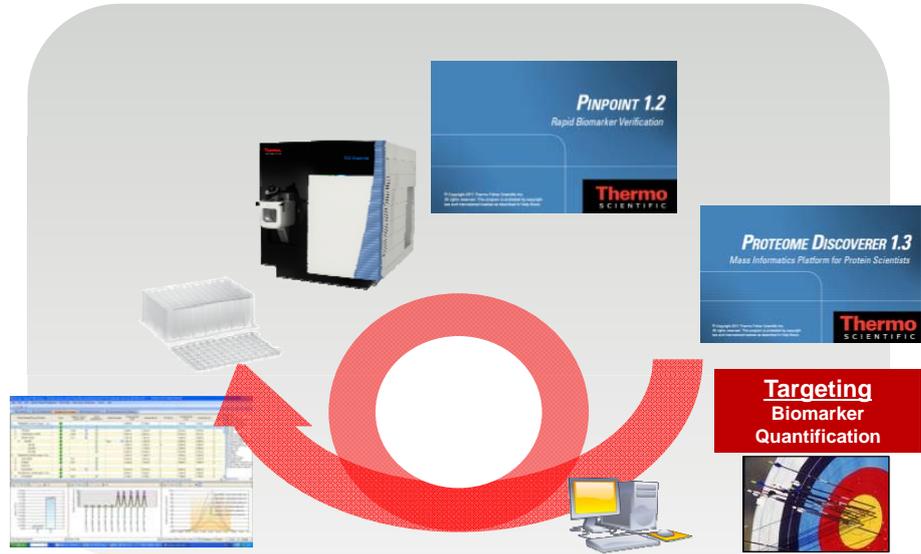
CID MS/MS

Top 6 y ions automatically selected as transitions per peptide target

56

ThermoFisher
SCIENTIFIC

ターゲットタンパク質定量の実施

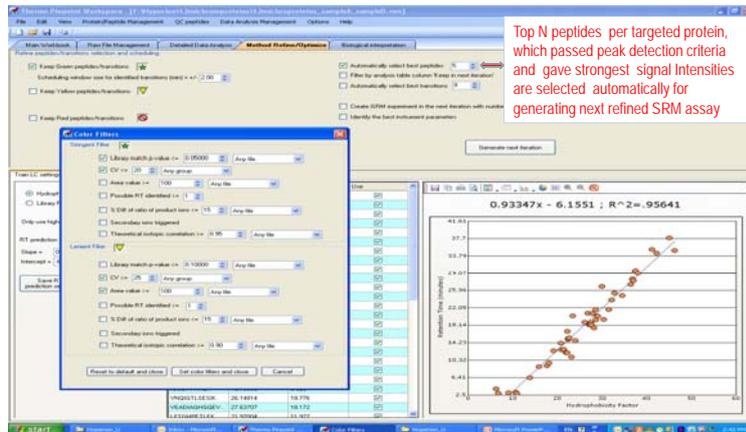


57

ThermoFisher
SCIENTIFIC

Pinpoint 1.3によるSRM測定メソッドの最適化

ソフトが自動的に選別した定量イオンによるSRM測定結果の解析。
ターゲット定量が不十分であったペプチドについてのみ、定量イオンやコリジョネルギーを変更するなど最適化を実施。

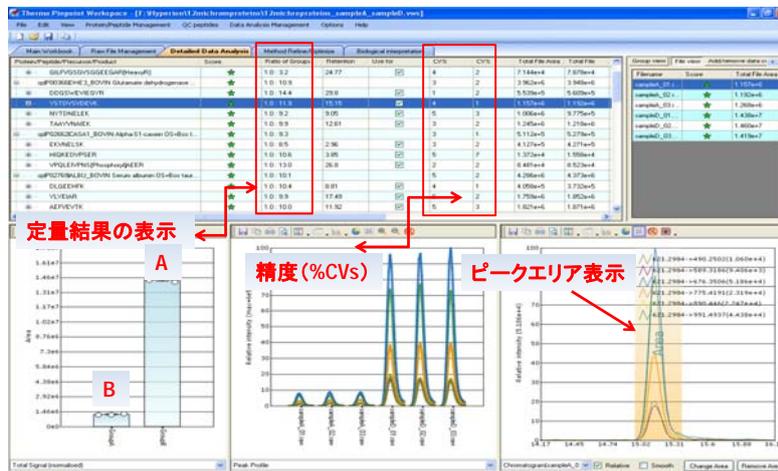


58

ThermoFisher
SCIENTIFIC

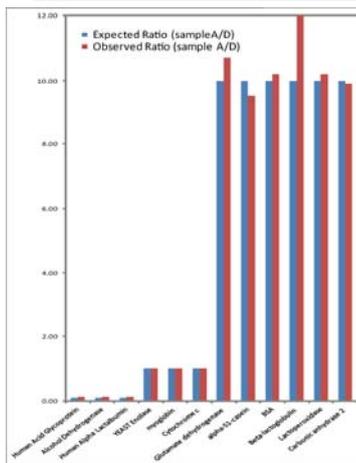
Pinpoint 1.3によるSRM測定結果の定量解析

最適化されたSRMメソッドによる実サンプル(AおよびB)の定量解析結果



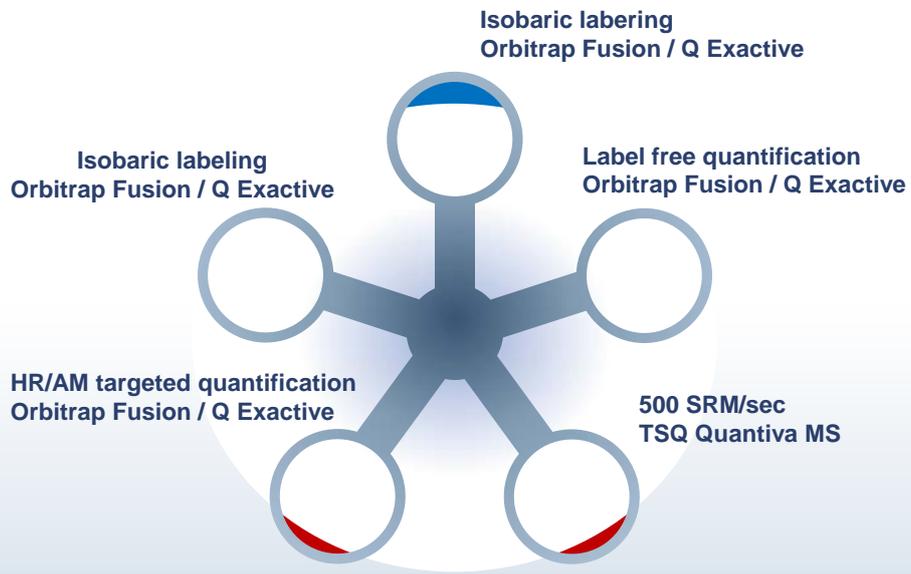
Pinpoint 1.3によるSRM測定結果の定量解析結果

最適化されたメソッドによるSRM測定の結果、E.Coli 500ngにスパイクされた12種類の標準タンパク質中、濃度の異なる3グループ(0.5~50fmol/uL)の精度の高い定量結果



Protein Target	Expected Ratio (sample A/D)	Observed Ratio (sample A/D)
Human Acid Glycoprotein	0.10	0.12
Alcohol Dehydrogenase	0.10	0.12
Human Alpha Lactalbumin	0.10	0.12
YEAST Enolase	1.0	1.0
myoglobin	1.0	1.0
Cytochrome c	1.0	1.0
Glutamate dehydrogenase	10.0	10.7
alpha-S1-casein	10.0	9.5
BSA	10.0	10.2
Beta-lactoglobulin	10.0	12.2
Lactoperoxidase	10.0	10.2
Carbonic anhydrase 2	10.0	9.9

Multiplexed Protein Quantification Strategies



61

ThermoFisher
SCIENTIFIC

